

Zum Wachstum von *Mycobacterium*
tuberculosis in der Objektträgerkultur

von

THEODOR STEINBACHER

1956 №95

Aus der I. Medizinischen Klinik
des Städtischen Krankenhauses Nürnberg

Vorstand:

Stadtmedizinaldirektor Prof. Dr.med.habil. D. Jahn.

Zum Wachstum von *Mycobacterium tuberculosis*
in der Objektträgerkultur.

=====

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich Alexander Universität Erlangen

vorgelegt von

Theodor Steinbacher

aus Nürnberg

Erlangen 1956.



Dekan: Prof. Dr.med. KORTH.

1. Referent: Prof. Dr.med. D. JAHN

2. Referent: Prof. Dr.med. M. KNORR

Tag der mündl. Prüfung: 17. und 18. Juli 1956.

Inhaltsverzeichnis:

Seite:

I. Einleitung	4
II. Methodik	6
III. Ergebnisse	7
1. Keimdichte und Bakterienwachstum	7
2. Abhängigkeit des Wachstums von der Wasserstoffionenkonzentration	13
3. Beeinflussung des Bakterien= wachstums durch organische Zusätze	21
4. Gesetzmäßigkeiten im Wachstum von Mikrokulturen	28
IV. Zusammenfassung	42
Literaturverzeichnis	43

I. EINLEITUNG.

Die bakteriologische Diagnostik der Tuberkulose steht vor der wesentlichen praktischen Schwierigkeit: sie hinkt der klinischen Diagnose oft um Wochen nach. Das bedeutet, daß zumeist ein eindeutiger klinischer Befund vorliegt, bevor der, dazu oft noch dem klinischen konträre, bakteriologische Bescheid erhalten werden kann. Diese Tatsache liegt nun weniger in der bakteriologischen Methodik, als vielmehr in der eigentümlichen Physiologie des *Mycobacterium tuberculosis* begründet. Die prinzipiellen Forderungen des Klinikers an eine bakteriologische Diagnose lassen sich ungefähr wie folgt angeben:

1. Die bakteriologische Diagnose soll rasch, im Optimum nach wenigen Tagen, erstellt werden.

Hier muß sich der Bakteriologe mit der Tatsache auseinandersetzen, daß *Mycobacterium tuberculosis* ein sehr langsames Wachstum, oder besser eine geringe Teilungsgeschwindigkeit besitzt. Auch auf optimalen Nährböden, wie etwa den von HOHN ¹⁾ oder PETRAGNANI ²⁾ angegebenen, ist bis zum Heranwachsen einer mit bloßem Auge erkennbaren Makrokolonie eine Zeitspanne von mindestens vier Wochen erforderlich. In dieser Zeitspanne ist aber die klinische Diagnose immer abgeschlossen. Man könnte nun darauf hinweisen, daß bei der praktischen bakteriologischen Diagnostik der Tuberkulose der Begriff „optimaler Nährboden“ eingeschränkt werden muß. Denn die für diagnostische Zwecke angegebenen Substrate besitzen nicht mehr die Eigenschaft, dem Tuberkelbakterium seine größte Teilungsgeschwindigkeit zu ermöglichen. Alle derartigen Nährböden besitzen Zusätze, die die Entwicklung von Fremdkeimen und Sporenbildnern hemmen sollen und damit auch - und das in nicht unbeträchtlichem Ausmaß - die Teilung der KOCH'schen Stäbchen behindern. Zusatzlose Nährböden sind unbrauchbar für diagnostische Zwecke. Die Frage, ob es gelingt, auf dem Umweg eines spezifischen Eingriffs in den Stoffwechsel des *Mycobacterium tuberculosis* eine Wachstumsbeschleunigung zu erhalten, die für diagnostische Zwecke ausreicht,

scheint noch nicht genügend untersucht und soll einleitend noch nicht diskutiert werden. Selbst wenn es nun gelänge, ohne die wachstumshemmenden Zusätze auszukommen, also auf einem wirklich optimalen Nährboden zu züchten, dürfte die Entwicklungszeit einer Makrokolonie kaum unter drei Wochen zu drücken sein. Diese Zeitspanne ist aber immer noch für die Bedürfnisse des Kliniklers zu lang.

Der logische Ausweg aus der geschilderten Situation erscheint nun dadurch gegeben, daß möglichst kleine Kolonien erkannt werden. Das führt in letzter Konsequenz zu einem Mikrokulturverfahren, wie es, allerdings zunächst für Resistenzbestimmungen, erstmals 1941 von PRYCE ³⁾, später von KREIS und BERNARD ⁴⁾, MEISSNER ⁵⁾, DISSMANN und IGLAUER ⁶⁾ angewandt und beschrieben worden ist.

2. Die bakteriologische Diagnose soll möglichst alle Offentuberkulösen als solche kennzeichnen.

Abgesehen von der Möglichkeit, Tuberkelbakterien im Sputum direkt nachzuweisen (Anreicherungsverfahren), hängt die Erfüllung dieser Forderung eng mit der Lösung des oben angeschnittenen Problems zusammen. Denn wenn es gelingt, eine minimale und bei reinen Ausstrichuntersuchungen leicht zu übersehende Stäbchenzahl in kurzer Zeit zu einer ausreichenden Vermehrung zu bringen, so genügt der einfachste Objektträgerausstrich den Forderungen einer sicheren bakteriologischen Diagnostik. Die diagnostische Bedeutung des ursprünglich nur für Resistenzbestimmungen entwickelten Mikrokulturverfahrens scheint damit gesichert.

Gerade im Hinblick auf diese diagnostische Bedeutung des Verfahrens erscheint es nützlich, die Wachstumsbedingungen des Keimes in der Mikrokultur zu untersuchen. Dabei darf erwartet werden, daß sich hier ein gegenüber der Makrokultur wesentlich andersartiges Verhalten der Keime einstellt. Denn prinzipiell sollten die Beziehungen der Mikrokultur zum Substrat, d.h. zum Milieu, andere sein als die der Makrokultur. Einige dieser Beziehungen, soweit sie durch einfache statistische Zählverfahren erfassbar sind, versucht die vorliegende Arbeit zu ermitteln.

II. METHODIK.

Die in den folgenden Abschnitten mitgeteilten Ergebnisse stützen sich auf das von PRYCE ³⁾ ursprünglich angegebene Verfahren, das wie folgt modifiziert wurde:

1.) Aufbereitung des Sputums: 10 Min. mit Glasperlen in Zentrifugenröhrchen homogenisieren.

2.) Ausstrichmethode: Homogenat in der üblichen Technik auf sterile Objektträger (13 x 76 mm, in Reagensgläser passend) ausstreichen, in halb geöffneter DRI-GALSKY-Schale bei 37°C 1 Stunde trocknen lassen, danach 6 Min. in ein Standgefäß mit 6% Schwefelsäure bringen, dann in 2 weiteren Gefäßen mit steriler physiologischer Kochsalzlösung zweimal waschen.

3.) Verimpfen: unter sterilen Bedingungen je 1 Objektträger in 1 Reagensglas, ca. 7 ml des Nährmediums enthaltend.

4.) Bebrüten: bei 37°C im stehenden Reagensglas.

5.) Färben: nach ZIEHL-NEELSEN analog gewöhnlichem Sputumausstrich.

6.) Zählverfahren: Die Auszählung erfolgt im Mikroskop nach einem bestimmten Schema. Der Objektträger wird dazu in ein unteres, mittleres, und oberes Feld (gerechnet vom Boden des Reagensglases aus) eingeteilt, von jedem dieser Felder werden 10 beliebige Gesichtsfelder ausgewählt und die Anzahl der Kolonien pro Gesichtsfeld sowie die Anzahl der Stäbchen pro Kolonie bestimmt.

Die Aufarbeitung der erhaltenen Zahlen ist nach später zu erläuternden statistischen Gesichtspunkten erfolgt.

III. ERGEBNISSE.

1. Keimdicke und Bakterienwachstum.

Die Tabelle 1 zeigt zusammen mit der Abbildung 1 die Abhängigkeit des Keimwachstums von der Dichte des Ausstriches. Trägt man auf der Abszisse die Anzahl der Kolonien pro Gesichtsfeld und auf der Ordinate die Anzahl der Bakterien pro Kolonie auf, so erhält man eine deutliche positive Abhängigkeit der Keimzahl von der Anzahl der Kolonien pro Gesichtsfeld. Es ist mit einem Blick zu sehen, daß mit steigender Keimdicke die Anzahl der Stäbchen pro Kolonie zunimmt. Beispielsweise finden sich bei 12 Kolonien pro Gesichtsfeld im Durchschnitt 6 Bakterien pro Kolonie, bei 17 Kolonien im Gesichtsfeld im Durchschnitt 9 Bakterien pro Kolonie. Bei geringen Keimdichten ist diese Abhängigkeit noch nicht so deutlich.

Der in Tabelle 2 durchgeführte STUDENT-Vergleich beweist, daß die Keimzahldifferenzen, die sich bei steigender primärer Keimdicke finden, echt sind; sie können statistisch gesichert werden und sind nicht zufallsbedingt. Teilt man beispielsweise, und wie in Tabelle 1 geschehen, die Anzahl der Kolonien pro Gesichtsfeld in 4 Bereiche ein, nämlich in den Bereich I = 1 - 5, II = 6 - 10, III = 11 - 15 und IV = 16 - 21 Kolonien pro Gesichtsfeld, so läßt sich zwar in den benachbarten Bereichen (z.B. II und III) keine echte Differenz nachweisen, doch findet sich eine solche immer beim Überspringen eines Intervalls (I und III, II und IV). Am einer echten Abhängigkeit ist also nicht zu zweifeln.

Der Befund erscheint nun in gewissem Sinne paradox, denn wenn überhaupt, hätte man eine negative Abhängigkeit, d.h. eine Abnahme der Keimzahl (Bakterien pro Kolonie) mit steigender Keimdicke (Kolonien pro Gesichtsfeld) erwarten sollen. Eine biologische Deutung dieses Verhaltens kann hier zunächst nur versucht werden.

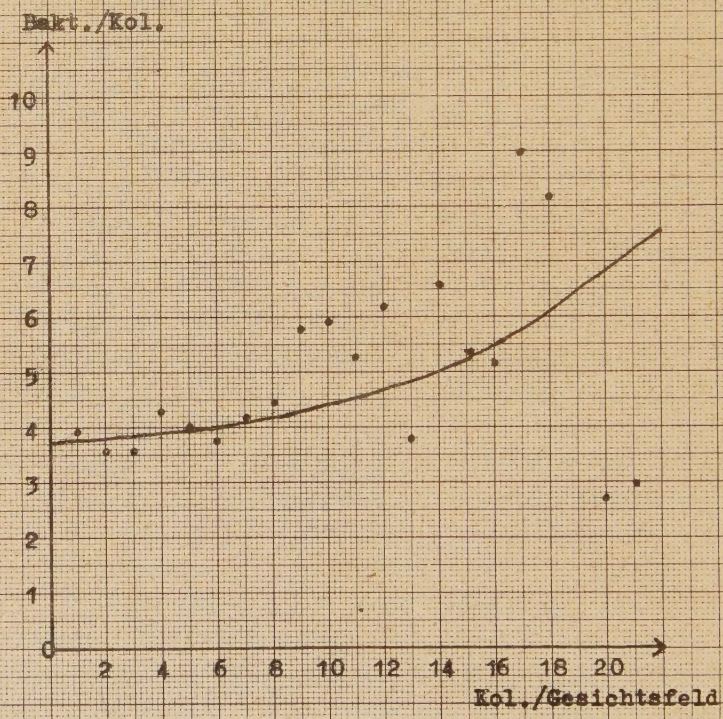


Abb. 1: Abhängigkeit der Keimzahl von der Keimdichte.

Tabelle 1

Bakt. Kolonien pro Gesichtsfeld					Bakt. Kolonien pro Gesichtsfeld				
Kol.	1- 5	6-10	11-15	16-21	Kol.	1- 5	6-10	11-15	16-21
1	1422	837	271	103	26	7	4	-	-
2	1037	567	167	57	27	4	5	3	3
3	395	191	63	16	28	8	3	2	1
4	241	120	37	29	29	2	5	2	-
5	161	79	32	15	30	9	10	8	7
6	99	36	14	4	31	4	5	-	-
7	62	38	18	5	32	5	2	1	1
8	82	43	26	4	33	1	-	-	1
9	38	23	11	2	34	2	1	4	2
10	40	28	10	4	35	8	11	4	1
11	21	6	-	3	36	1	3	-	3
12	23	24	12	2	37	-	2	-	-
13	18	8	3	1	38	2	1	1	-
14	19	6	4	4	39	3	4	-	-
15	25	8	4	2	40	9	7	3	-
16	15	7	6	1	41	1	5	-	2
17	12	5	5	1	42	1	2	1	-
18	20	16	12	2	43	1	1	-	-
19	7	8	2	-	44	2	-	1	-
20	9	12	3	1	45	1	-	-	-
21	8	6	3	3	46	1	1	-	-
22	15	11	7	-	47	2	2	-	-
23	5	5	4	1	48	1	-	-	-
24	6	3	4	-	49	1	4	2	-
25	11	13	5	2	50	3	-	5	2

Bereich	I	II	III	IV
umfaßt Kol./Gesfd.	1- 5	6-10	11-15	16-21
Bakt./Kol. 1.Mittel:	3,92	4,51	5,76	6,07

Tabelle 2

STUDENT-Vergleich der Daten der Tabelle 1.

	n	FG	$\bar{x}$	Sx^2	$S^2 = 42,01$
I	3870	3869	3,92	138674	$S\bar{x} = 0,17$
II	2176	2175	4,51	115217	$t = 0,017$
	6046	6044	0,59	253891	$Pt > 10 \%$
	n	FG	$\bar{x}$	Sx^2	$S^2 = 59,08$
II	2176	2175	4,51	115217	$S\bar{x} = 1,024$
III	760	759	5,76	58117	$t = 1,28$
	2936	2934	1,25	173334	$Pt \approx 10 \%$
	n	FG	$\bar{x}$	Sx^2	$S^2 = 79,32$
III	760	759	5,76	58117	$S\bar{x} = 0,625$
IV	281	280	6,07	24298	$t = 0,193$
	1041	1039	0,31	82416	$Pt \approx 5 \%$
	n	FG	$\bar{x}$	Sx^2	$S^2 = 42,49$
I	3870	3869	3,92	138674	$S\bar{x} = 0,82$
III	760	759	5,76	58117	$t = 2,24$
	4630	4628	1,84	196719	$Pt \ 2 < 5 \%$
	n	FG	$\bar{x}$	Sx^2	$S^2 = 56,823$
II	2176	2175	4,51	115217	$S\bar{x} = 0,477$
IV	281	280	6,07	24298	$t = 3,25$
	2457	2455	1,55	139515	$Pt < 1 \%$

Erläuterung:

I bis IV = Spalten der Tabelle 1

n = Häufigkeit

S^2 = Varianz

FG = Freiheitsgrade

$S\bar{x}$ = mittlerer Fehler

$\bar{x}$ = Summe

t = STUDENT-Wert

Sx^2 = Summe der Quadrate

Pt = Wahrscheinlichkeit von t

Übersetzt man zunächst den mathematischen Inhalt der Statistik ins Biologische, so sagt die Signifikanz der gefundenen t-Werte aus, daß die Wahrscheinlichkeit, Kolonien größerer Stäbchenzahl zu finden, mit Abnahme des linearen Abstandes der Kolonien untereinander steigt.

Für diesen Tatbestand gibt es nun folgende Deutungsmöglichkeiten:

1.) Die Kolonien beeinflussen sich gegenseitig im positiven Sinne in ihrem Wachstum.

a) Als Grund hierfür steht zunächst die Absonderung noch unbekannter wachstumsbeschleunigender Faktoren durch die wachsenden Keime selbst zur Diskussion (beispielsweise Stoffe von Vitamin- und Provitamin-Charakter). Da bei größerer Koloniedichte höhere örtliche Konzentrationen an diesen Stoffen zu erwarten sind, würde dies für alle Kolonien ein durchschnittlich besseres Milieu bedeuten. Damit wäre das im Durchschnitt gesteigerte Wachstum der Einzelkolonien erklärt.

b) In Serum- Nährböden kann der Keim die zugesetzten Eiweißstoffe nicht in der Form verarbeiten oder gebrauchen wie sie ihm angeboten werden. Es ist ein vorbereitender Abbau notwendig, der natürlich bei primär größerer Koloniedichte rascher vor sich geht und so die Bedingungen der Hypothese 1.a) wiederherstellt. Es würde sich hier allerdings nicht um die Bildung von Substanzen mit Wirkstoff-Charakter, sondern um die Bildung von Aminosäuren handeln.

2.) Eine weitere Deutungsmöglichkeit des Verhaltens der Kolonien hat die Tatsache zur Grundlage, daß die Dichte des Ausstriches von der Dichte der Keime im Sputum, das zur Anfertigung der Ausstriche verwendet worden war, abhängig ist. Man kann überlegen, daß Sputen mit primär schon hohen Keimdichten aus im Durchschnitt virulenteren Keimen bestehen wie Sputen mit geringerer Keimdichte. Wenn der Virulenzbegriff dahingehend gedeutet wird, daß er die durchschnittliche Fähigkeit eines Keimes, sich zu vermeh-

ren, beinhaltet, müßten in dichterem Ausstrichen mit größerer Wahrscheinlichkeit Keime höherer Teilungsgeschwindigkeit gefunden werden. Das Ergebnis der Keimzählung findet auch in dieser Deutung eine Erklärung.

3.) Bekannterweise enthalten alle bakteriologischen Nährböden auch wachstumshemmende Zusätze (z.B. Malachitgrün), ebenso besitzt Serum, das häufig den flüssigen Substraten zugefügt wird, Faktoren, die das Bakterienwachstum hemmen. Es wäre anzunehmen, daß das Bakterium, beispielsweise durch Bildung von Fermenten, diese Substanzen abbaut oder deren Valenzen absättigt. Bei größerer Keimdichte würde dann ein schnellerer Abbau dieser hemmenden Substanzen bewirkt und somit ein besseres Wachstum ermöglicht. (Verdünnungseffekt der Inhibitoren).

4.) Schließlich ist bei größerer Keimdichte und folglich geringerem linearen Abstand der Kolonien untereinander die Wahrscheinlichkeit, daß sich im Verlaufe des Wachstums mehrere kleinere Kolonien zu einer Kolonie von der mehrfachen Stäbchenzahl vereinigen können, entsprechend größer. Aus 2 Primärkeimen können beispielsweise in einer gewissen Zeitspanne sowohl 2 Kolonien von je 20 Bakterien wie auch, sofern die Entfernung zwischen beiden gering genug ist, eine Kolonie von 40 Stäbchen heranwachsen. Man kann beim Auszählen nicht mehr feststellen, ob eine Kolonie aus einem oder mehreren Primärkeimen herangewachsen ist. Dieser Verschmelzungsprozess vermindert natürlich die Anzahl der Kolonien im Gesichtsfeld, die wir als Kriterium für die Dichte des Ausstriches herangezogen haben. Somit wäre einerseits ein Anstieg der Keimzahl mit steigender Keimdichte, andererseits eine sekundäre Abnahme der Keimdichte mit steigender Keimzahl zu erwarten. Beide Komponenten wirken einander entgegengesetzt. Die graphische Darstellung der durchschnittlichen Keimzahl als Funktion der Keimdichte müßte, wenn dies zutrifft, einer GAUSS'schen Kurve entsprechen. Die Kurve der Abbildung 1 wäre dann als ansteigender Ast dieser GAUSS'schen Kurve aufzufassen.

Die dargestellten Alternativen können mit den hier gestellten Versuchsansätzen noch nicht entschieden werden,

sodaß das gesetzmäßige Verhalten der Keime zunächst noch nicht weiter diskutiert werden soll.

2. Abhängigkeit des Wachstums von der Wasserstoffionenkonzentration.

Eine weitere Untersuchungsserie beschäftigt sich mit der Beeinflussung des Wachstums durch verschiedene Wasserstoffionenkonzentrationen. LOCKEMANN ⁷⁾ gibt für seinen Original - Nährboden einen Ausgangswert von $P_H = 5,2$ an. Spätere Arbeiten (KIRCHNER ⁸⁾, UNHOLTZ ⁹⁾) verlangen einen P_H -Wert von 6,5 bis 6,8. Die Tabelle 4 vergleicht zur Klärung dieser Frage das Wachstum von Tuberkelbakterien in einem Medium von der in Tabelle 3 gezeigten Zusammensetzung bei den P_H -Werten 5,8, 6,5 und 7,2. Die in der Tabelle 4 gegebenen Einzelwerte sind Mittelwerte (Bakterien pro Kolonie), die durch Auszählen der Anzahl der Keime der in 60 Gesichtsfeldern befindlichen Kolonien gewonnen worden sind. Es wird deutlich, daß beispielsweise bei $P_H = 7,2$ am 1. Tag die durchschnittliche Stäbchenzahl pro Kolonie 1,67 betrug; nach 20 Tagen Wachstum steigt dann die Anzahl der Stäbe auf 2,19 im Durchschnitt an. Das bedeutet also praktisch kein Wachstum. Ähnlich verhält sich der Nährboden, der auf $P_H = 5,8$ gestellt worden war. Deutliches Wachstum konnte lediglich bei $P_H = 6,5$ festgestellt werden. Diese Tatsache wird auch durch die über die gesamte Wachstumszeit gemittelten Keimzahlen erhärtet. Einer Keimzahl von durchschnittlich 4,35 Stäbchen pro Kolonie stehen Keimzahldurchschnitte von 2,18 und 1,95 bei P_H -Werten von 5,8 und 7,2 gegenüber (während 20 Tagen Wachstum).

Untersucht man nun die Zeitabschnitte, in denen überhaupt ein Wachstum stattgefunden hat, so erhält man die Ergebnisse der Tabellen 5a, 5b, 6a und 6b. In ihnen wird die Streuung der Keimdurchschnittszahlen pro Tag für 2 Zeitabschnitte untersucht, nämlich für den Zeitabschnitt 1, der den 1. mit 8. Tag, und den Zeitabschnitt 2, der den 9. mit 20. Tag umfaßt. Es wird geprüft, wann eine echte Abhängigkeit der Keimzahldifferenzen auftritt. Das Prüfmittel sind

die für die betreffenden Zeitabschnitte angestellten Varianzanalysen ¹⁰⁾. Wie Tabelle 5a ausweist, läßt sich bei LOCKEMANN $P_H = 6,5$ (ohne organische Zusätze) in den ersten 8 Tagen des Beobachtungszeitraumes kein Wachstum nachweisen. Einen signifikanten FISCHER-Quotienten der Gruppenstreuung, das ist also die durch die Tage bedingte Streuung, erhält man erst für den Zeitabschnitt vom 9. mit 20. Tag. (Siehe Tabelle 5b).

Die Tabelle 6a behandelt in ähnlicher Weise alle untersuchten P_H -Werte, wobei diesmal die Gruppen 1. mit 8. und 9. mit 20. Tag miteinander verglichen werden. Es dient dies zur Prüfung der bereits oben aufgeworfenen Frage, ob die in den beiden Zeitabschnitten ermittelten Wachstumsdifferenzen von beispielsweise 2,03 und 2,48 Bakterien pro Kolonie = 0,45 Bakterien pro Kolonie, echt sind. Für den auf $P_H = 5,8$ und 6,5 gestellten Nährboden läßt sich tatsächlich die Echtheit der Differenz nachweisen, nicht aber für das Medium mit $P_H = 7,2$. Hier findet sich bei einer Differenz von nur 0,11 Bakterien pro Kolonie ein der Differenz zugehöriger insignifikanter FISCHER-Quotient von 1,00. Bei einem P_H von 7,2 ist also unter unseren Versuchsbedingungen ein Wachstum nicht mehr nachweisbar.

Die Abbildung 2 zeigt die P_H -Abhängigkeit des durchschnittlichen Wachstums graphisch. Es ist interessant, in wieweit eine solche besteht.

Tabelle 3: synthetischer Nährboden nach LOCKEMANN.

Mononatriumphosphat	3,0
Monokaliumphosphat	4,0
Magnesiumsulfat	2,5
Natriumcitrat	2,5
Ferriammonsulfat	0,01
Asparagin	5,0
Glycerin	25,0
Aqua dest.	ad 1000,0

Das P_H der Lösung beträgt 5,2 und wird mittels NaOH eingestellt auf 5,8. 6,5 und 7,2

Tabelle 4

Abhängigkeit des Wachstums von *Mycobacterium tuberculosis* auf LOCKEMANN'schem Medium von der Wasserstoffionenkonzentration.

Keimzahldurchschnitte (Bakterien pro Kolonie):

Tag	$P_H =$	5,8	6,5	7,2
1.		1,69	2,00	1,67
2.		1,77	1,69	1,79
3.		1,80	2,02	2,22
4.		1,89	2,17	2,42
5.		2,14	2,14	1,64
6.		2,30	2,93	1,84
7.		2,49	2,48	1,67
8.		2,14	2,81	1,92
9.		2,62	5,40	1,93
10.		2,50	4,44	2,07
12.		2,64	6,90	2,01
14.		2,16	7,81	2,10
16.		.	5,79	1,85
18.		.	6,39	1,92
20.		.	10,22	2,19
Mittel $\bar{x}$		2,18	4,35	1,95

Tabelle 5a

Varianzanalyse der Daten der Tabelle 4.

LOCKEMANN $P_H = 6,5$ Zahl der Bakterien.

Tag	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
	40	65	16	25	34	20	22	46
	48	58	38	72	70	46	32	70
	12	15	9	44	48	27	24	48
	8	12	20	8	8	40	16	68
	15	6	6	10	15	40	5	40
	12	7		12	7	12	12	12
	21	16		8	8	14	14	14
					9	9	14	32
						16		27
								10
								12
SX_n	156	179	89	180	199	223	139	379
k	7	7	5	7	8	9	8	11

Streuung:

FG:

Gesamt- $Sx_1^2 = 21924$ 61 $S_1^2 = 359,4$

Gruppen- $Sx_2^2 = 1765$ 7 $S_2^2 = 252,0$

Rest- $Sx_3^2 = 20177$ 54 $S_3^2 = 373,6$

FISCHER-Quotient $F = 0,68$

Wahrscheinlichkeit $P_F > 5 \%$

Gruppenstreuung nicht signifikant !

Tabelle 5b (Fortsetzung der Tabelle 5a).

Tag	9.	10.	12.	14.	16.	18.	20.
21	16	14	28	42	9	4	
36	26	44	51	35	64	28	
30	36	15	28	28	45	24	
16	24	32	65	30	32	16	
25	35	35	54	48	75	40	
48	12	24	14	28	60	30	
21	7	42	83	32	77	42	
64	24	72	63	27	72	32	
45	18	54	30	60	54	9	
30	30	30	33	11	30	50	
22	11	36	60	24	55	48	
12	12	39	39	13	24	39	
75	17	42	56	30	78	45	
32	19	16	45	32	28	48	
17	24	51	48	18	15	36	
30		18	17	28	16	19	
		21	18		18	100	
		22	21		20	21	
		23	22		50	23	
		24	21		27	24	
		26	27		28	100	
		28	35		31	28	
		34				120	
						35	
SX _n	524	311	742	876	486	908	961
k	16	15	23	22	16	22	24

Streuung:

FG:

Gesamt- $Sx_1^2 = 54217$ 137 $S_1^2 = 395,7$

Gruppen- $Sx_2^2 = 5546$ 6 $S_2^2 = 924,3$

Rest- $Sx_3^2 = 48617$ 131 $S_3^2 = 371,5$

FISCHER-Quotient $F = 2,49$ Wahrscheinlichkeit $P_F < 10\%$

Gruppenstreuung signifikant !

Tabelle 6a

Varianzanalyse der Daten der Tabelle 4.

$P_H = 5,8$	1.-8. Tag	9.-14. Tag	1.-14. Tag
Bakt./Kol. i.M.	2,03	2,48	2,18

FG:

$Sx_1^2 = 1,26$	11	$S_1^2 = 0,115$
$Sx_2^2 = 0,55$	1	$S_2^2 = 0,55$
$Sx_3^2 = 0,71$	10	$S_3^2 = 0,07$

FISCHER-Quotient $F = 7,85$

$P_H = 6,5$	1.-8. Tag	9.-20. Tag	1.-20. Tag
Bakt./Kol. i.M.	2,28	6,71	4,35

FG:

$Sx_1^2 = 95,82$	14	$S_1^2 = 6,84$
$Sx_2^2 = 73,17$	1	$S_2^2 = 73,17$
$Sx_3^2 = 22,65$	13	$S_3^2 = 1,74$

FISCHER-Quotient $F = 42,05$

$P_H = 7,2$	1.-8. Tag	9.-20. Tag	1.-20. Tag
Bakt./Kol. i.M.	1,90	2,01	1,95

FG:

$Sx_1^2 = 0,70$	14	$S_1^2 = 0,05$
$Sx_2^2 = 0,05$	1	$S_2^2 = 0,05$
$Sx_3^2 = 0,65$	13	$S_3^2 = 0,05$

FISCHER-Quotient $F = 1,00$

Tabelle 6b

(Fortsetzung der Tabelle 6a).

Keimzahldurchschnitte des 1. mit 20. Beobachtungstages.

		$P_H = 5,8$	$P_H = 7,2$
Bakt./Kol. i.M.		2,18	1,95
FG:			
$Sx_1^2 = 2,31$	26	$S_1^2 = 0,089$	
$Sx_2^2 = 0,35$	1	$S_2^2 = 0,35$	
$Sx_3^2 = 1,96$	25	$S_3^2 = 0,078$	
FISCHER-Quotient $F = 4,49$			

		$P_H = 5,8$	$P_H = 6,5$	$P_H = 7,2$
Bakt./Kol. i.M.		2,18	4,35	1,95
FG:				
$Sx_1^2 = 148,92$	41	$S_1^2 = 3,63$		
$Sx_2^2 = 51,14$	2	$S_2^2 = 25,57$		
$Sx_3^2 = 97,78$	39	$S_3^2 = 2,51$		
FISCHER-Quotient $F = 10,19$				

Anmerkung zur Abbildung 2 auf Seite 20 :

Die Abbildung 2 zeigt die Abhängigkeit des Wachstums vom P_H -Wert des Mediums.

y = durchschnittliche Keimzahl (Bakt./Kol.)

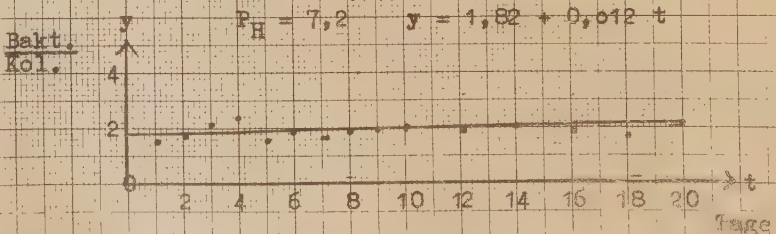
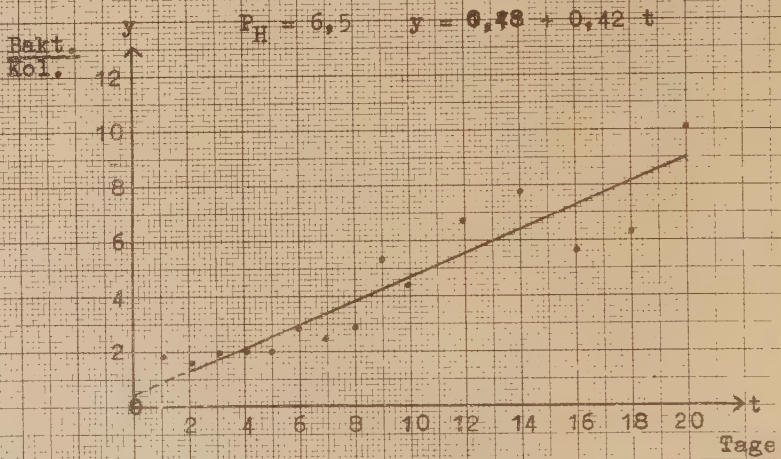
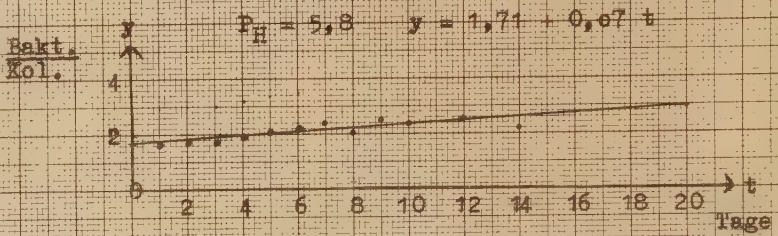
t = Wachstumsdauer (Tage).

Den Werten der Tabelle 4 wurde eine Gerade mit der Gleichung:

$$y = a + bt$$

angepasst.

Abbildung 2



3. Beeinflussung des Bakterienwachstums durch organische Zusätze.

Der Abschnitt 3 setzt sich mit der Beeinflussung des Bakterienwachstums durch organische Zusätze zu den verschiedenen synthetischen Medien auseinander. Es ist

a) inaktiviertes Rinderserum in einer Konzentration von 10 % zu den in Tabelle 7 näher spezifizierten vollsynthetischen Medien nach UNHOLTZ, DISSMANN und LOCKEMANN,

b) Hämin in Konzentrationen von 0,2 mg% und 0,5 mg% zum Medium nach UNHOLTZ

zugesetzt worden. (Über die Darstellung des Hämins siehe Fußnote.)

Vergleicht man die Zahlenwerte der Tabellen 8 und 9 zunächst mit denen der Tabellen 4, 5 und 6, so wird der Einfluß des Rinderserums sowohl wie des Hämins auf einen Blick deutlich. Die Wachstumssteigerung, die diese beiden Substanzen bedingen, ist groß. Beispielsweise zählt man in den Medien ohne organische Zusätze selbst bei optimaler Wasserstoffionenkonzentration am 7. Tag durchschnittliche

Hämin-Darstellung nach GATTERMANN-WIELANDT 11):

In einem Rundkolben werden 3 ltr. Eisessig und 5 ml gesättigte Kochsalzlösung auf dem Sandbad auf 100 °C erhitzt. Aus einem Tropftrichter läßt man unter häufigem Umschwenken des Kolbens 1 ltr. defibriniertes Rinderblut im Verlauf von etwa 30 Min. in das heiße Lösungsmittel einfließen, ohne das Erhitzen zu unterbrechen. Berührung der Kolbenwand durch einfließendes Blut ist dabei tunlichst zu vermeiden. Die Temperatur soll nicht unter 90 °C sinken. Nach dem Einlaufen des Blutes hält man noch 15 Min. 90 °C ein, läßt dann auf ca. 40 °C abkühlen und saugt bei dieser Temperatur das Hämin ab. Darauf wird es mit 50 % Essigsäure Wasser, Alkohol und Äther gewaschen.

Die dunklen Kristalle von starkem Oberflächenglanz sind in schwacher Säure oder Lauge löslich. Die Ausbeute beträgt 3 - 4 g aus 1 ltr. Blut.

Keimzahlen von 2,48 Keimen pro Kolonie, während das gleiche Medium mit Serumzusatz einen Keimdurchschnitt von 5,74 Stäbchen pro Kolonie bringt. Die Zahlen für den 10. Beobachtungstag ermitteln sich zu 4,44 gegen 11,38 Bakterien pro Kolonie. Wesentlich größere Zunahmen der Keimzahlen allerdings lassen sich erreichen, wenn man statt des von LOCKEMANN angegebenen Nährbodens UNHOLTZ'sche oder DISSMANN'sche Kulturflüssigkeit verwendet. Das trifft vor allem für den UNHOLTZ'schen Nährboden zu, der am 7. Beobachtungstag bei Serumzusatz eine durchschnittliche Keimzahl von 17,17 , bei Häminzusatz eine solche von 15,41 bzw. 15,76 Bakterien pro Kolonie ermöglicht.

Was den Vergleich des Wachstums in Nährböden mit organischen Zusätzen anlangt, so ist dieser wieder in Form einer Varianzanalyse in der Tabelle 9 durchgeführt. Es wurden dabei die mittleren Keimzahldifferenzen der verschiedenen Medien bis zum 10. Beobachtungstag verglichen. In jedem Falle erweist sich der UNHOLTZ'sche Nährboden den von DISSMANN und LOCKEMANN angegebenen Substraten bezüglich seiner Wachstumseigenschaften überlegen. Der Vergleich des Wachstums im UNHOLTZ'schen Medium bei Serumzusatz und bei Häminzusatz ergab für die genannte Zeitspanne keine signifikanten Keimzahldifferenzen, (Tabelle 9c) sodaß in der vorliegenden Versuchsanordnung der Zusatz von Hämin dem Serumzusatz gleichwertig angesehen werden kann. Die Tabelle 9b weist darüber hinaus nach, daß in beiden untersuchten Konzentrationsbereichen des Hämins (0,2 und 0,5 mg%) ebenfalls ein praktisch gleichstarkes Wachstum erfolgt, sodaß hier keine Abhängigkeit des Wachstums von der Häminkonzentration besteht. Die Tabellen 9d bis 9f führen die restlichen Vergleiche der verschiedenen Nährböden untereinander vollends durch. Sie bestätigen im Wesentlichen die weiter oben gemachten Aussagen.

Zusammenfassend haben die Untersuchungsreihen dieses Abschnittes ergeben:

- 1.) Bei jedem untersuchten Medium bewirkt der Zusatz von 10 % Rinderserum eine deutliche Wachstumssteigerung der Tuberkelbakterien.

2.) Die 3 untereinander untersuchten Substrate sind bezüglich der Fähigkeit, das *Mycobacterium tuberculosis* zur Vermehrung zu bringen, nicht gleichwertig. In aufsteigender Folge lassen sie sich durch die Reihe:

LOCKEMANN

DISSMANN

UNHOLTZ

bewerten, wobei das nachfolgende Medium dem vorhergehenden überlegen ist.

3.) Der Zusatz von 0,2 bzw. 0,5 mg % Hämin zum UNHOLTZ'schen Substrat bewirkt die gleiche Wachstumssteigerung wie der Zusatz von 10 % inaktiviertem Rinderserum.

4.) In den beiden untersuchten Konzentrationsbereichen des Hämins (0,2 und 0,5 mg %) besteht keine Konzentrationsabhängigkeit des Wachstums der Tuberkelbakterien.

Tabelle 7

Zusammensetzung der Nährböden mit organischen Zusätzen.

1.) KIRCHNER-Substrat modifiziert nach UNHOLTZ:

Dinatriumphosphat	3,0
Monokaliumphosphat	4,0
Magnesiumsulfat	0,6
Natriumcitrat	2,5
Asparagin	5,0
Alanin	2,0
1% wäßrige Malachitgrünlösung	1,0
1% wäßrige Ferriamonsulfatlösung	5,0
Glycerin bidest.	20,0
Aqua dest.	ad 1000,0

dieser vollsynthetischen Basalnährlösung ist

- a) 10 % inaktiviertes Rinderserum,
- b) 0,2 mg % Hämin,
- c) 0,5 mg % Hämin

zugefügt worden.

Tabelle 7 (Fortsetzung).

(Nährböden mit organischen Zusätzen)

2.) KIRCHNER-Substrat modifiziert nach DISSMANN:

Dinatriumphosphat	2,5
Monokaliumphosphat	1,5
Magnesiumsulfat	0,5
Natriumcitrat	1,5
Ferriammoncitrat	0,05
Asparagin	2,0
Alanin	0,15
0,2 % wäßr. Malachitgrünlösung	1,0
Glycerin bidest.	25,0
Aqua dest.	ad 1000,0

dieser vollsynthetischen Basalnährlösung wurde

10 % inaktiviertes Rinderserum

zugesezt.

3.) LOCKEMANN-Substrat:

Darstellung wie in Tabelle 3 beschrieben;

P_H mit Natronlauge auf 6,5 eingestellt.

dieser vollsynthetischen Basalnährlösung wurde

10 % inaktiviertes Rinderserum

zugesezt.

Tabelle 8

Wachstum von *Mycobacterium tuberculosis*
auf Nährböden mit organischen Zusätzen.

Nährboden:		UNHOLTZ		DISSMANN	LOCKEMANN
Zusatz:					
Rinderserum	10%			10%	10%
Hämin		0,2mg%	0,5mg%		
Tag:					
0.	1,44	.	.	1,59	.
1.	1,87	1,84	1,82	1,83	2,06
2.	2,04	2,00	2,31	1,94	2,47
3.	4,04	3,83	3,52	2,68	2,51
4.	4,91	.	.	4,31	.
5.	6,58	6,37	7,01	4,93	3,59
6.	14,98	.	.	7,69	.
7.	17,17	15,41	15,76	9,24	5,74
8.	20,72	.	.	14,49	.
9.	26,32	.	.	.	.
10.	31,06	29,80	28,95	.	11,38
12.	∞	∞	∞	.	.
15.	.	.	.	.	∞
$\bar{y}$ =	11,92	9,89	9,91	5,41	4,63

$\bar{y}$ = Mittel der Keimzahldurchschnitte bis zum 10. Tag
∞ = Koloniegröße nicht mehr zählbar.

Tabelle 9

Varianzanalyse der Daten der Tabelle 8.

9a) UNHOLTZ mit 10 % Serum $\bar{y} = 11,92$
 DISSMANN mit 10 % Serum $\bar{y} = 5,41$ $d_y = 6,51$

FG:

$$\begin{aligned} Sx_1^2 &= 1496,00 & 19 & S_1^2 = 78,7 \\ Sx_2^2 &= 210,00 & 1 & S_2^2 = 210,0 \\ Sx_3^2 &= 1286,00 & 18 & S_3^2 = 71,4 \end{aligned}$$

FISCHER-Quotient $F = 2,94$

9b) UNHOLTZ mit 0,2 mg% Hämin $\bar{y} = 9,89$
 UNHOLTZ mit 0,5 mg% Hämin $\bar{y} = 9,91$ $d_y = 0,02$

FG:

$$\begin{aligned} Sx_1^2 &= 1172,45 & 11 & S_1^2 = 106,59 \\ Sx_2^2 &= 0,10 & 1 & S_2^2 = 0,10 \\ Sx_3^2 &= 1172,35 & 10 & S_3^2 = 117,24 \end{aligned}$$

FISCHER-Quotient $F = 0,00085$

9c) UNHOLTZ mit 10 % Serum $\bar{y} = 11,92$
 UNHOLTZ mit 0,2 mg% Hämin $\bar{y} = 9,89$
 UNHOLTZ mit 0,5 mg% Hämin $\bar{y} = 9,91$

FG:

$$\begin{aligned} Sx_1^2 &= 2332,00 & 22 & S_1^2 = 106,00 \\ Sx_2^2 &= 23,59 & 2 & S_2^2 = 11,80 \\ Sx_3^2 &= 2308,41 & 20 & S_3^2 = 115,42 \end{aligned}$$

FISCHER-Quotient $F = 0,1022$

Tabelle 9 (Fortsetzung).

9d) UNHOLTZ mit Hämin (beide Konz.) $\bar{y} = 9,90$
 DISSMANN mit 10 % Serum $\bar{y} = 5,41$

FG:

$$Sx_1^2 = 1426 \quad 20 \quad S_1^2 = 71,3$$

$$Sx_2^2 = 104 \quad 1 \quad S_2^2 = 104,0 \quad \text{vgl. 9e) !}$$

$$Sx_3^2 = 1322 \quad 19 \quad S_3^2 = 69,6$$

$$\text{FISCHER-Quotient } F = 1,495$$

9e) UNHOLTZ mit 0,2 mg% Hämin $\bar{y} = 9,89$
 UNHOLTZ mit 0,5 mg% Hämin $\bar{y} = 9,91$
 DISSMANN mit 10 % Serum $\bar{y} = 5,41$

FG:

$$Sx_1^2 = 1426 \quad 20 \quad S_1^2 = 71,3$$

$$Sx_2^2 = 104 \quad 2 \quad S_2^2 = 52,0 \quad \text{vgl. 9d) !}$$

$$Sx_3^2 = 1322 \quad 18 \quad S_3^2 = 16,5$$

$$\text{FISCHER-Quotient } F = 0,704$$

9f) DISSMANN mit 10 % Serum $\bar{y} = 5,41$
 LOCKEMANN mit 10 % Serum $\bar{y} = 4,63$

$$d_y = 0,78$$

FG:

$$Sx_1^2 = 216 \quad 14 \quad S_1^2 = 15,4$$

$$Sx_2^2 = 2 \quad 1 \quad S_2^2 = 2,0$$

$$Sx_3^2 = 214 \quad 13 \quad S_3^2 = 16,5$$

$$\text{FISCHER-Quotient } F = 0,1215$$

4. Gesetzmäßigkeiten im Wachstum von Mikrokulturen.

Der Abschnitt 4 setzt sich mit der Gesetzmäßigkeit des Bakterienzuwachses in halbsynthetischen Medien, d.h. Medien mit Zusatz von 10 % inaktiviertem Rinderserum bzw. 0,2 und 0,5 mg % Hämin, auseinander. Er bemüht sich gleichzeitig um eine exakte mathematische Formulierung dieses Zuwachses, wobei im Wesentlichen zwei Kurventypen, nämlich logarithmische und logistische Kurven, den Zählergebnissen angepasst werden. Eine derartige Untersuchung erscheint schon im Hinblick auf die Möglichkeit notwendig, daß einige wenige Beobachtungsdaten extrapoliert werden können, so daß auch Resistenzbestimmungen wesentlich rascher zu stellen wären.

Es ist nun bekannt, daß der Zuwachs einer Bakterienkolonie bzw. einer Bakterienkultur überhaupt bestimmten qualitativen Gesetzmäßigkeiten gehorcht. Man unterscheidet am besten drei Phasen:

a) eine Phase des Anwachsens, d.h. denjenigen Zeitabschnitt, in dem die eingepflichtete Bakterienmenge sich nur geringfügig und relativ langsam vermehrt.

b) eine Phase der logarithmischen Vermehrung der Keime, d.h. den Zeitabschnitt, in dem der Bakterienzuwachs im Medium einem Exponentialgesetz gehorcht. Man kann in diesem Zusammenhang von einer praktisch sich in der Geschwindigkeit ständig steigenden Vermehrung der Bakterien sprechen. Diese zweite Phase geht je nach den Bedingungen des Milieus über in

c) eine angenähert stationäre Phase, in der sich der Zuwachs der Kultur mit der Absterbequote die Waage hält. Hier bleibt die Zahl der lebenden Individuen der Kolonie konstant.

Die beschriebene qualitative Gesetzmäßigkeit gilt nicht nur für Bakterienkolonien, sondern für jede ökologische Einheit überhaupt.

Bei Kenntnis ausreichender Daten läßt sich nun das geschilderte qualitative Verhalten durch verschiedene Kurven beschreiben. Die bekanntesten hiervon sind die

sogenannten GOMPERTZ-Kurven ¹²⁾ bzw. die logistischen Kurven von PEARSON. Die GOMPERTZ-Kurve ist eine Kurve des Typs, der durch die Gleichung:

$$\log Y_c = \log k + (\log a)b^t \quad 1)$$

gegeben ist. Die von PEARSON angegebene logistische Kurve wird durch die Gleichung:

$$Y_c = \frac{k}{1 + e^{\frac{a+bt}{b}}} \quad 2)$$

definiert. Schließlich ist noch eine einfache Exponentialfunktion möglich, nämlich:

$$\log Y_c = a + bt \quad 3a)$$

bzw.:

$$Y_c = a + e^{bt} \quad 3b)$$

Welche der drei Kurventypen im Einzelfall vorgezogen werden soll, kann von vornherein nicht entschieden werden. Das im folgenden gegebene Material ist deswegen sowohl durch logistische Kurventypen wie auch durch reine Exponentialkurven beschrieben worden.

Was zunächst die Darstellung der Versuchsdaten durch PEARSON-Kurven anlangt, so wird das Rechenschema hierfür am Beispiel des Wachstums der Tuberkulosebakterien in einem Nährboden nach UNHOLTZ mit 10 % Serumzusatz erläutert (Tabelle 10). Wesentlich ist, daß für die Bestimmung der Konstanten k , a und b bestimmte, über die Zeit gemittelte Werte (y_0 , y_1 , y_2) herangezogen werden müssen. Die Konstante k , die das Maximum und den 2. Wendepunkt der Kurve bestimmt, ist dabei durch die Versuchsdaten bzw. deren Mittelwerte gegeben. Bei einer Beobachtungszeit von 0 bis 10 Tagen, wie im Beispiel der Berechnung zugrunde gelegt, erhält man deswegen zwar eine genaue Beschreibung des Wachstumsverlaufs bis etwa 6 bis 7 Tage, es erfolgen jedoch beträchtliche Abweichungen von den Beobachtungsdaten für alle Zeitspannen über 7 Tage hinaus. Denn die Konstante k ist aus einem Zeitabschnitt bestimmt, in dem noch logarithmisches Wachstum erwartet werden kann.

Die Tabelle 11 gibt im übrigen die Werte der Konstanten k , a und b für alle hier untersuchten Nährsubstrate mit organischen Zusätzen, sowie die Gleichungen der logistischen Kurven wieder.

Da die Versuchsdauer die für die Anpassung einer logistischen Funktion notwendigen Daten nicht zu liefern schien, ist in den Tabellen 12 und 13 eine reine Exponentialfunktion den Daten angepaßt worden. Der Rechnungsgang ist der Tabelle 12 zu entnehmen. Die Tabelle 13 gibt die Werte der Konstanten a und des Potenzexponenten b , sowie die Gleichungen der logarithmischen Wachstumskurven für jeden untersuchten Nährboden wieder.

Untersucht man die Summe der Abweichungen der angepaßten Kurven von den ermittelten Werten, wie dies in Tabelle 14 geschehen ist, so wird deutlich, daß in jedem Einzelfall die logarithmische Kurve die geringere Abweichung vom experimentellen Ergebnis bringt. Diese Tatsache wird aus den Abbildungen 3 bis 7, die den logistischen Kurventyp dem Exponentialtyp gegenüberstellen, besonders deutlich. Lediglich das Wachstum des *Mycobacterium tuberculosis* im UN-HOLTZ'schen Medium mit 10 % Rinderserumzusatz wird durch die logistische Gleichung besser beschrieben. Das hat seinen Grund in dem Umstand, daß in dem untersuchten Zeitabschnitt bereits die 3. Phase des Koloniewachstums, nämlich die stationäre Phase, weitgehend erreicht worden ist.

Beschränkt man sich auf Zeitabschnitte bis zu 7 bis 8 Tagen, so erscheint deswegen die Anpassung einer reinen Exponentialkurve das Gegebene.

Zusammenfassend ergeben die dargestellten Untersuchungsreihen folgendes:

- 1.) Von den prinzipiellen Möglichkeiten, experimentelle Wachstumskurven durch mathematische Ausdrücke zu beschreiben, hat sich die Darstellung des Wachstumsverlaufes während der ersten 10 Beobachtungstage des *Mycobacterium tuberculosis* durch reine Exponentialfunktionen als am günstigsten erwiesen. Die Summe der Abweichungen bzw. der Abweichungsquadrate der theoretischen von den wahren Werten ist hier ein Minimum.

2.) Wie die Abbildungen 3 bis 7 beweisen, ist mit dieser Darstellung eine Extrapolation der Versuchswerte über die 7-Tage-Grenze hinaus bis zu etwa 20 Tagen mit einiger Sicherheit möglich.

3.) Der untersuchte Kurventyp berechnet den Zuwachs der Mikrokulturen exakt und mit einem Minimum an Konstanten.

4.) Die Deutung dieser Konstanten als biologische Größen erscheint möglich und sollte Ansatzpunkt zu einer wesentlich exakteren Definition des Resistenzbegriffes geben, als die bisherigen Indexzahlen, die hierzu verwendet wurden.

Tabelle 10

Beispiel für die Berechnung einer logistischen Wachstumskurve (UNHOLTZ-Substrat mit Serumzusatz).

Tag	Zähl- ergebnis	Code Nr.	
t	y_a	x	
0.	1,44	-1	
1.	1,87	0	$y_0 = 1,78$
2.	2,04	1	
3.	4,04	2	
4.	4,91	3	
5.	6,58	4	$y_1 = 8,82$
6.	14,98	5	
7.	17,17	6	
8.	20,72	7	
9.	26,32	8	$y_2 = 26,03$
10.	31,06	9	

Tabelle 10 (Fortsetzung).

Rechnungsgang:

$$k = \frac{817,34 - 2163,34}{46,33 - 77,79} = 42,78$$

$$a = \log_e 23,033 = 3,137$$

$$b = \frac{1}{4} \log_e 0,167 = - 0,447$$

$$Y_c = \frac{42,78}{1 + e^{3,137 - 0,447t}}$$

Die aus dieser Gleichung berechneten Einzelwerte entnehme man der Tabelle 14a !

Formeln:

$$Y_c = \frac{k}{1 + e^{a+bt}}$$

$$k = \frac{2y_0y_1y_2 - y_1^2(y_0+y_2)}{y_0y_2 - y_1^2}$$

$$a = \log_e \frac{k - y_0}{y_0}$$

$$b = \frac{1}{n} \log_e \frac{y_0(k-y_1)}{y_1(k-y_0)}$$

n = Differenz der y_0 und y_1 (ebenso y_1 und y_2) zugeordneten x -Werte

$$e = 2,71828$$

Tabelle 11

Logistische Wachstumskurven von *Mycobacterium tuberculosis* auf Nährböden mit organischen Zusätzen.

UNHOLTZ mit 10 % Serum:

$$k = 42,78$$

$$Y_c = \frac{42,78}{1 + e^{3,137 - 0,447t}}$$

$$a = 3,137$$

$$b = -0,447$$

UNHOLTZ mit 0,2 mg% Hämin:

$$k = 51,44$$

$$Y_c = \frac{51,44}{1 + e^{2,949 - 0,409t}}$$

$$a = 2,949$$

$$b = -0,409$$

UNHOLTZ mit 0,5 mg% Hämin:

$$k = 43,02$$

$$Y_c = \frac{43,02}{1 + e^{2,764 - 0,436t}}$$

$$a = 2,764$$

$$b = -0,436$$

DISSMANN mit 10 % Serum:

$$k = 38,39$$

$$Y_c = \frac{38,39}{1 + e^{3,018 - 0,315t}}$$

$$a = 3,018$$

$$b = -0,315$$

LOCKEMANN mit 10 % Serum:

$$k = 44,16$$

$$Y_c = \frac{44,16}{1 + e^{2,879 - 0,186t}}$$

$$a = 2,879$$

$$b = -0,186$$

Die Berechnung obenstehender Gleichungen erfolgte wie in Tabelle 10 dargestellt !

Tabelle 12

Beispiel für die Berechnung einer logarithmischen Wachstumskurve (DISSMANN mit 10 % Serumzusatz).

Tag	Keimzahl	
t	y _a	log y
0.	1,59	0,20140
1.	1,83	0,26245
2.	1,94	0,28780
3.	2,68	0,42814
4.	4,31	0,63448
5.	4,93	0,69285
6.	7,69	0,88593
7.	9,24	0,96567
8.	14,49	1,16107

Rechnungsgang: Einsetzen der log y Werte in die Geradengleichung: $y = a + bt$

$$n = 9$$

$$SX = 36 \quad \bar{x} = 4 \quad (SX)^2 = 1296 \quad (SX)^2/n = 144$$

$$SX^2 = 204$$

$$SY = 5,52 \quad \bar{y} = 0,613$$

$$SXY = 29,488 \quad (SX)(SY)/n = 22,08$$

$$Sx^2 = 60 \quad Sxy = 7,409$$

$$\log y_0 = 0,613 + 0,1235(t - 4)$$

$$\log y_0 = 0,119 + 0,124t$$

=====

Erläuterung:

n = Anzahl der Einzelwerte

SX = Summe der x-Werte (bzw. t) $\bar{x} = SX/n$

SY = Summe der y-Werte $\bar{y} = SY/n$

SX² = Summe der Quadrate der x-Einzelwerte (hier T)

SXY = Summe der einzelnen xy-Produkte

$$Sx^2 = SX^2 - (SX)^2/n \quad Sxy = SXY - (SX)(SY)/n$$

$$y_0 = \bar{y} + \frac{Sxy}{Sx^2} (x - \bar{x})$$

Tabelle 13

Logarithmische Wachstumskurven von *Mycobacterium tuberculosis* in Nährböden mit organischen Zusätzen.

UNHOLTZ mit 10 % Rinderserum:

$$\log y_c = 0,11 + 0,15t$$

UNHOLTZ mit 0,2 mg% Hämin:

$$\log y_c = 0,105 + 0,142t$$

UNHOLTZ mit 0,5 mg% Hämin:

$$\log y_c = 0,125 + 0,14t$$

DISSMANN mit 10 % Rinderserum:

$$\log y_c = 0,119 + 0,124t$$

LOCKEMANN mit 10 % Rinderserum:

$$\log y_c = 0,194 + 0,082t$$

(Die Berechnung obenstehender Gleichungen erfolgte wie in Tabelle 12 vorgeführt).

Tabelle 14

Abweichung der Einzelwerte der berechneten
Wachstumskurven vom Zählergebnis.

Erläuterung:

t = Bebrütungsdauer in Tagen

y_a = Auszählergebnis (Bakt./Kol. im Durchschnitt)

y_c = berechneter Wert der Keimzahl

$d_y = y_c - y_a$ = Abweichung des berechneten Wertes

Sd_y = Summe der Abweichungen d_y

$\bar{d}_y$ = Mittelwert der Abweichungen

Sd_y^2 = Summe der Abweichungsquadrate.

14a) UNHOLTZ mit 10 % Serumzusatz:

Tag	Zähl- wert	logistische Kurve		logarithmische Kurve	
t	y_a	y_c	d_y	y_c	d_y
0.	1,44	1,16	-0,28	1,28	-0,16
1.	1,87	1,78	-0,09	1,82	-0,05
2.	2,04	2,72	+0,68	2,57	+0,53
3.	4,04	4,11	+0,07	3,63	-0,39
4.	4,91	6,09	+1,18	5,13	+0,24
5.	6,58	8,81	+2,23	6,92	+0,34
6.	14,98	12,35	-2,63	10,24	-4,74
7.	17,17	16,61	-0,56	14,46	-2,71
8.	20,72	21,30	+0,58	20,42	-0,30
9.	26,32	26,01	-0,31	28,84	+2,52
10.	31,06	30,29	-0,72	40,47	+9,68

$$Sd_y = +1,27$$

$$Sd_y = +4,96$$

$$\bar{d}_y = 0,12$$

$$\bar{d}_y = 0,45$$

$$Sd_y^2 = 15,1$$

$$Sd_y^2 = 130,59$$

14b) UNHOLTZ mit Zusatz von 0,2 mg% Hämin:

Tag	Zählwert	logistische Kurve		logarithmische Kurve	
t	y _a	y _c	d _y	y _c	d _y
1.	1,84	1,73	-0,11	1,77	-0,07
2.	2,00	2,56	+0,56	2,45	+0,45
3.	3,83	3,76	-0,07	3,40	-0,43
4.		5,46		4,71	
5.	6,37	7,80	+1,43	6,53	+0,16
6.		10,89		9,06	
7.	15,41	14,83	-0,58	12,56	-2,85
8.		19,49		17,42	
9.		24,61		24,16	
10.	29,80	29,84	+0,04	33,50	+3,70
		Sd _y = +1,27		Sd _y = +0,96	
		d _y = 0,21		d _y = 0,16	
		Sd _y ² = 2,71		Sd _y ² = 22,05	

14c) UNHOLTZ mit Zusatz von 0,5 mg% Hämin:

Tag	Zählwert	logistische Kurve		logarithmische Kurve	
t	y _a	y _c	d _y	y _c	d _y
1.	1,82	1,68	-0,14	1,84	+0,02
2.	2,31	2,55	+0,24	2,54	+0,23
3.	3,52	3,82	+0,30	3,51	-0,01
4.		5,64		4,84	
5.	7,01	8,13	+1,12	6,68	-0,33
6.		11,40		9,23	
7.	15,76	15,40	-0,36	12,74	-3,02
8.		19,92		17,85	
9.		24,59		24,27	
10.	28,95	28,97	+0,02	33,50	+4,55
		Sd _y = +1,18		Sd _y = +1,44	
		d _y = 0,20		d _y = 0,24	
		Sd _y ² = 1,55		Sd _y ² = 29,99	

14d) DISSMANN mit 10 % Serumzusatz:

Tag	Zähl- wert	logistische Kurve		logarithmische Kurve	
t	y_a	y_c	d_y	y_c	d_y
0.	1,59	1,32	-0,27	1,32	-0,27
1.	1,83	1,79	-0,04	1,71	-0,12
2.	1,94	2,41	+0,47	2,33	+0,39
3.	2,68	3,23	+0,55	3,10	+0,42
4.	4,31	4,29	-0,02	4,12	-0,19
5.	4,93	5,64	+0,71	5,48	+0,55
6.	7,69	7,34	-0,35	7,29	-0,40
7.	9,24	9,39	+0,15	9,71	+0,47
8.	14,49	11,79	-2,70	12,91	-1,58
		$Sd_y = -1,50$		$Sd_y = -0,73$	
		$\bar{d}_y = 0,17$		$\bar{d}_y = 0,08$	
		$Sd_y^2 = 8,54$		$Sd_y^2 = 3,63$	

14e) LOCKEMANN mit 10 % Serumzusatz:

Tag	Zähl- wert	logistische Kurve		logarithmische Kurve	
t	y_a	y_c	d_y	y_c	d_y
1.	2,06	2,06	-	1,89	-0,17
2.	2,47	2,35	-0,12	2,28	-0,19
3.	2,51	2,80	+0,29	2,75	+0,24
4.		3,33		3,33	
5.	3,59	3,95	+0,36	4,02	+0,43
6.		4,67		4,85	
7.	5,74	5,50	-0,24	5,86	+0,12
8.		6,47		7,08	
9.		7,56		8,55	
10.	11,38	8,79	-2,95	10,33	-1,05
		$Sd_y = -2,30$		$Sd_y = -0,62$	
		$\bar{d}_y = 0,38$		$\bar{d}_y = 0,10$	
		$Sd_y^2 = 6,99$		$Sd_y^2 = 1,82$	

Abbildungen 3 bis 7 :

Wachstum von *Mycobacterium tuberculosis* auf
Nährböden mit organischen Zusätzen.

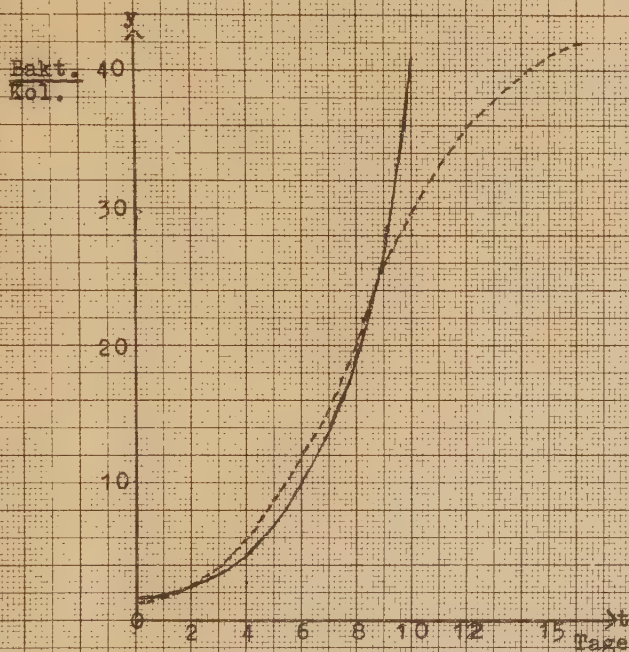


Abb. 3: UNHOLTZ mit 10 % Serumzusatz.

Erläuterungen zu den Abbildungen 3 bis 7 :

y = Keimzahl durchschnitt (Bakt./Kol.)

t = Bebrütungsdauer in Tagen

----- = logistische Wachstumskurve

————— = logarithmische Wachstumskurve.

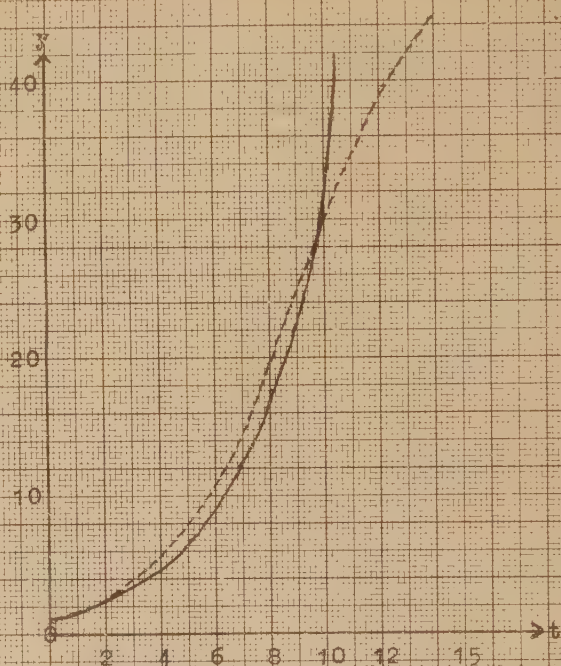


Abb. 4: UNHOLTZ mit Zusatz von 0,2 mg% Hämin

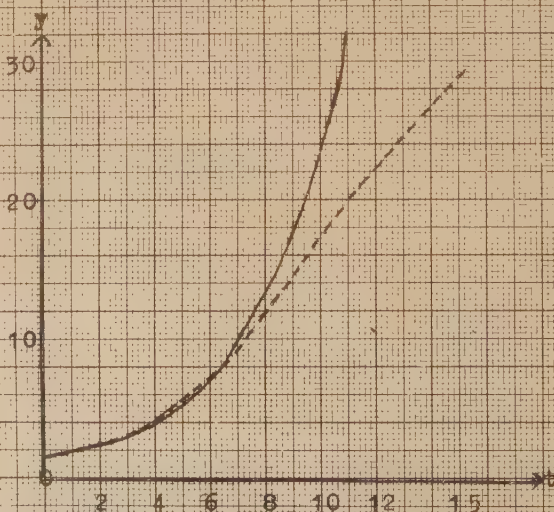


Abb. 5: DISSMANN mit 10 % Serumzusatz

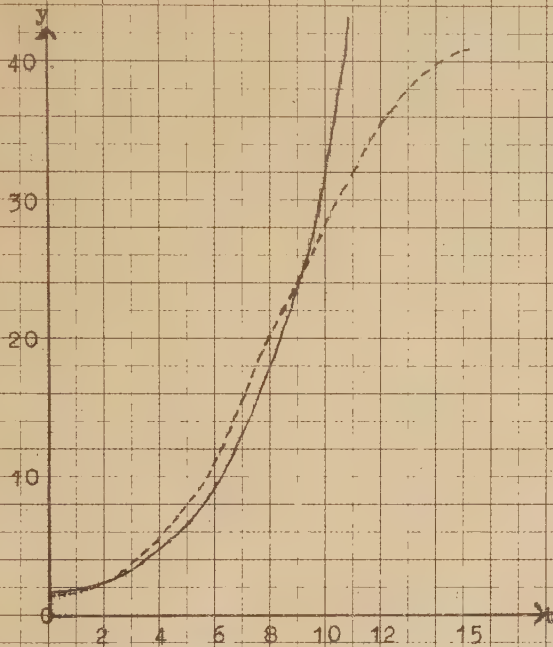


Abb. 6: UNHOLTZ mit Zusatz von 0,5 mg% Hämín

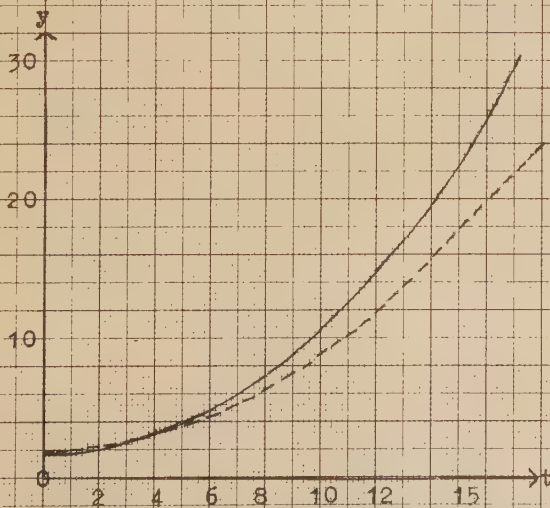


Abb. 7: LOCKEMANN mit 10 % Serumzusatz

IV. ZUSAMMENFASSUNG.

Die Ergebnisse der Untersuchungsreihen, die sich speziell mit den Bedingungen des optimalen Wachstums einer Mikrokolonie und ihrer Gesetzmäßigkeit auseinandergesetzt haben, können abschließend in ihrer Gesamtheit etwa wie folgt zusammengefaßt werden:

Die Entwicklung, vor allem die Endwicklungsgeschwindigkeit, einer Mikrokolonie ist im Wesentlichen von drei Faktoren abhängig, nämlich:

- 1.) Von der Dichte der primär auf den Objektträger gebrachten Keime im Ausstrich.
- 2.) Von einer Wasserstoffionenkonzentration des Nährmediums, deren Optimum bei $P_H = 6,5$ liegt.
- 3.) Vom Zusatz von Serum oder Hämin zum ursprünglich vollsynthetischen Nährboden.

Der Zusatz bestimmter Aminosäuren scheint, mit Ausnahme von Asparagin, gegenüber den unter 3.) erwähnten Faktoren von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Werden die erwähnten drei Bedingungen eingehalten, so läßt sich der Zuwachs einer Mikrokolonie angenähert durch eine Exponentialgleichung beschreiben, die für die Zeitspanne von 15 Tagen aus den Zählergebnissen des 1. bis 5. Beobachtungstages extrapoliert werden kann. Der Keimzuwachs aus einer Einzelkolonie beträgt für den 1. bis 10. Tag bei dem optimalen UNHOLTZ-KIRCHNER-Substrat 30,6 Bakterien pro Kolonie. Die Teilungsgeschwindigkeit, die aus der Wachstumskurve berechnet werden kann, ist beim optimalsten untersuchten Medium angenähert 2,6 Tage. Eine höhere Teilungsgeschwindigkeit ließ sich mit den untersuchten Medien bzw. deren Variationen nicht erreichen.

Auf eine ausführliche Diskussion des Untersuchungsbefundes im Bezug auf den Wert des Resistenzbegriffs überhaupt soll hier noch nicht eingegangen werden. Jedoch scheint die Verwendung des Potenzexponenten der logarithmischen Gleichung, bzw. dessen Reziproken, zu ermöglichen, daß der Resistenzbegriff in direkte Beziehung zur Teilungs-

geschwindigkeit gebracht wird. Damit würde der Resistenz = begriff von der prozentualen Abschätzung der in einem Medium mit bestimmter Antibiotica-Konzentration vorhandenen noch wachsenden (= noch teilungsfähigen) Keime, die prinzipiell immer willkürlich ist, unabhängig gemacht. Ein standardisiertes Medium ist dafür allerdings Voraussetzung.

LITERATUR:

- 1) HOHN, J., Zbl.Bakteriol. 145.(1940), 145;
- 2) PETRAGNANI: Boll.Ist.sieroterap.milan. 1926, Vol.5,H.3;
ref.: Zbl.ges.Tbk.-Forsch. 26.(1927), 703;
- 3) PRYCE: Journ.Path.and Bact. 53.(1941), 327;
ref.: Tb.arzt 4.(1950), 10: 616;
- 4) BERNARD, Et. und KREIS, B.: Rev.de la Tbc. 13.(1949),
9-10: 737; ref.: Tb.arzt 4.(1950), 10: 616;
- 5) MEISSNER, G.: Jahrb.Tbk.Forsch.Inst. Borstel 1950/51,
S.365 u.folg. siehe auch Beitr.Klin.Tbk. 106 (1952):
518;
- 6) DISSMANN, E. und IGLAUER, E.: Tb.arzt 4.(1950),11: 629;
vgl. auch ESKUCHEN, HAIN und SUEHLING: Tb.arzt 5.(1951), 8:
437;
- 7) LOCKEMANN: Zbl.Bakteriol. 83.(1919): 420;
- 8) KIRCHNER, O.: Zbl.Bakteriol. 124.(1932): 403;
- 9) UNHOLTZ, K.: Z.Tbk. 94.(1950), 3-4: 192;
- 10) SNEDECOR, G. W., Statistical Methods, 1950 by The Jowa
State College Press, S. 214 u. folg.;
- 11) GATTERMANN - WIELANDT, Die Praxis des organischen Chemikers, 29.Aufl.1942, Walter de Gruyter & Co. Berlin,
S. 394;
- 12) CROXTON and COWDEN, Applied General Statistics, 1951 by
Prentice Hall Inc. New York, S. 450 u. folg.

Es ist mir eine angenehme Pflicht,
Herrn Prof. Dr. med. D. JAHN, Direktor der
I. Medizinischen Klinik im Städt. Krankenhaus
Nürnberg, für die Überlassung des Themas und
die Übernahme des Referates zur vorliegenden
Arbeit zu danken.

Herrn Dr. HILLER bin ich zu großem Dank
verpflichtet für die Unterstützung bei der
Durchführung der erforderlichen Laborarbeiten.

Lebenslauf.

Am 10. September 1930 wurde ich, Theodor Steinbacher, als Sohn des Lungenfacharztes Dr.med. Theodor Steinbacher und dessen Ehefrau Emmy, geb. Sulzer, zu Nürnberg geboren. Nach vierjähriger Volksschulzeit besuchte ich die Oberschule in Nürnberg und Neumarkt/Opf. und erhielt am Ende der 8. Klasse im Sommer 1950 das Reifezeugnis der Oberrealschule III zu Nürnberg.

Im November 1950 begann ich das Medizinstudium an der Universität zu Erlangen. Dort bestand ich nach einem vorklinischen Studium von 5 Semestern im März 1953 die ärztliche Vorprüfung mit dem Gesamturteil "gut". Nach weiteren 6 Semestern klinischen Studiums zu Erlangen unterzog ich mich dem ärztlichen Staatsexamen, welches ich im Juni 1956 mit "gut" bestand.

